

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A61K 37/24, 47/42		A1	(11) 国際公開番号 WO 94/27630
			(43) 国際公開日 1994年12月8日(08.12.94)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00876 (22) 国際出願日 1994年5月31日(31. 05. 94)		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) 優先権データ 特願平5/152749 1993年5月31日(31. 05. 93) JP		添付公開書類 国際調査報告書	
(71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 科研製薬株式会社 (KAKEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒113 東京都文京区本駒込二丁目28番8号 Tokyo, (JP)			
(72) 発明者;および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 茂 義人(IKADA, Yoshito)(JP/JP) 〒611 京都府宇治市五ヶ庄広岡谷2-182 Kyoto, (JP) 田畑泰彦(TABATA, Yasuhiko)(JP/JP) 〒611 京都府宇治市琵琶台3-8-16 Kyoto, (JP) 土方重樹(HIJIKATA, Shigeki)(JP/JP) 〒426 静岡県藤枝市大西町2-14-12-421 Shizuoka, (JP) 田村 誠(TAMURA, Makoto)(JP/JP) 〒520-21 滋賀県大津市大江7-3-17 Shiga, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 中村静男, 外(NAKAMURA, Shizuo et al.) 〒110 東京都台東区東上野1丁目25番12号 熊切ビル2階 Tokyo, (JP)			

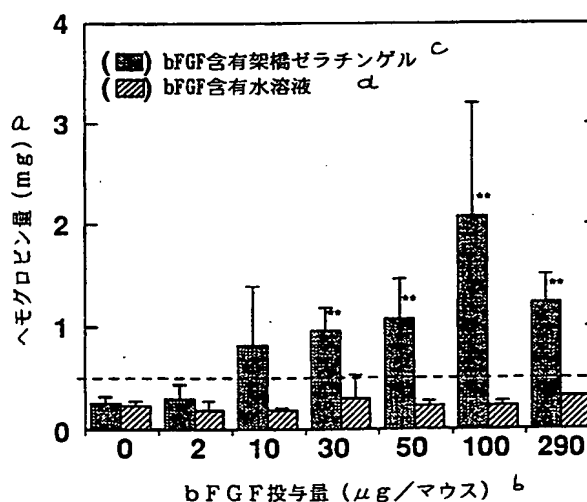
(54) Title : CROSS-LINKED GELATIN GEL PREPARATION CONTAINING BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR

(54) 発明の名称 塩基性線維芽細胞増殖因子含有架橋ゼラチンゲル製剤

- a: Amount of hemoglobin (mg)
b: Dose of bFGF (μg/mouse)
c: bFGF-containing cross-linked gelatin gel
d: bFGF-containing aqueous solution

(57) Abstract

A cross-linked gelatin gel preparation containing a basic fibroblast growth factor (bFGF) wherein the gel is used as the sustained release carrier and the moisture content or the capability of *in vivo* degradation and absorption can be varied with a change in the conditions of preparing the gel. The invention preparation serves to vary appropriately the sustained release time of bFGF and control the persistence of *in vivo* exhibition of the bFGF activity.



(**: p < 0.01)

BEST AVAILABLE COPY

(57) 要約

本発明は、徐放性担体として架橋ゼラチンゲルを利用した塩基性線維芽細胞増殖因子（以下、bFGFという）を含有することを特徴とする架橋ゼラチンゲル製剤であって、架橋ゼラチンゲルの調製条件を変えることによって、異なる含水率すなわち生体内での分解吸収性の異なるbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤に関する。本発明の架橋ゼラチンゲル製剤は、bFGFの徐放時間を適宜変化させることができ、生体内でのbFGFの活性発現の持続性をコントロールできるものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	CZ	チェッコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド
AT	オーストリア	DE	ドイツ	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	ES	スペイン	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナファソ	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BR	ブラジル	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チャド
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	ML	マリ	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TT	トリニダードトバゴ
CI	コートジボワール	IT	イタリア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	JP	日本	NE	ニジェール	US	米国
CN	中国	KE	ケニア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CS	チェコスロヴァキア	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	VN	ベトナム

田月糸田 登

塩基性線維芽細胞増殖因子含有架橋ゼラチンゲル製剤

産業上の利用分野

本発明は、塩基性線維芽細胞増殖因子（Basic Fibroblast Growth Factor、以下b F G Fと略称する）を含有することを特徴とする架橋ゼラチンゲル製剤に関するものである。

従来技術

b F G Fは、1974年にGospodarowiczによって、ウシ脳下垂体から線維芽細胞の増殖を強く刺激するタンパク質として見出された（Nature；24巻、124頁、1974年）。その後b F G Fをコードする遺伝子がクローニングされ、遺伝子組み換え技術を用いた大量生産が可能になり、b F G Fの研究は精力的に行われるようになった。その結果、線維芽細胞ばかりでなく、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、角膜内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの多種類の細胞に対する細胞増殖を刺激することが明らかになってきた。

しかし、b F G Fは、他のポリペプチドおよびタンパク質と同様に生体内半減期が短く、水溶液として投与したのでは期待する効果が得られない。そのため、b F G Fを安定に保ち、ある一定の期間徐々に放出することのできる徐放化製剤とすることが望ましい。そこで、本発明者らはb F G Fの徐放化製剤化を目的としてb F G Fの徐放化担体の開発を進めてきた。

近年、生理活性ペプチドおよびタンパク質の徐放化製剤が広く研究されており、その徐放化担体として、ポリグリコール酸・乳酸、ポリ酸無水物などの生体分解性合成高分子、多糖類あるいはタンパク質などの天然高分子の生体内分解吸収性高分子が挙げられる。

発明が解決しようとする課題

生体内分解吸収性天然高分子は、生体適合性に優れ、生体に対する刺激が少ないため徐放性担体として好ましいが、これらの多くは水溶性であり、水溶性の生理活性ペプチドであるbFGFの徐放化不溶性担体としては適していない。

そこで、本発明者らは、生体内分解吸収性天然高分子を何等かの方法で水不溶化し、bFGFの徐放化不溶性担体として使用できるものを得ることを目的として検討を進めてきた。

その結果、生体内分解吸収性天然高分子であるゼラチンを架橋処理することにより水不溶性とした架橋ゼラチンゲルが、bFGFの徐放化担体として適していることを見出し本発明を完成させた。

発明の開示

すなわち、本発明は、塩基性線維芽細胞増殖因子を含有することを特徴とする架橋ゼラチンゲル製剤を要旨とする。

本発明は、生体適合性が良く、生体に対する刺激が少ない、徐放性担体として優れた性質を有する架橋ゼラチンゲルを用い、適宜所望の徐放速度とすることが出来るbFGFの徐放性製剤を提供することに特徴を有する。徐放速度は、ゼラチンの架橋の程度、架橋ゼラチンゲルの含水率、用いるゼラチンの性質（等電点など）により変化させることが可能である。

図面の簡単な説明

図1は、bFGF水溶液（bFGF100 μ g）マウス皮下投与における周辺組織のヘモグロビン量の経時的変化を示す図である。

図2は、架橋ゼラチンゲル（含水率95.9%）製剤（bFGF100 μ g）マウス皮下埋入における周辺組織のヘモグロビン量の経時的変化を示す図である。

図3は、マウス皮下埋入架橋ゼラチンゲル（含水率95.2%）製剤（bFG

F 1 0 0 μ g) の残存重量の経時的变化を示す図である。

図 4 は、b F G F の投与量と投与部位周辺組織のヘモグロビン量の関係を示す図である。

図 5 は、マウス皮下埋入架橋ゼラチンゲル製剤 (b F G F 1 0 0 μ g) 埋入 7 日目における埋入部位周辺組織のヘモグロビン量と架橋ゼラチンゲルの含水率の関係を示す図である。

図 6 は、マウス皮下埋入架橋ゼラチンゲル製剤 (b F G F 1 0 0 μ g) 埋入 1 4 日目における埋入部位周辺組織のヘモグロビン量と架橋ゼラチンゲルの含水率の関係を示す図である。

図 7 は、含水率の異なる架橋ゼラチンゲル製剤 (b F G F 1 0 0 μ g) のマウス皮下埋入後の残存重量の経時的变化を示す図である。

図 8 は、架橋ゼラチンゲル製剤 (b F G F 1 0 0 μ g) のマウス皮下埋入 7 日目における肉芽組織形成とゲル含水率の関係を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の架橋ゼラチンゲル製剤は、徐放性担体架橋ゼラチンゲルに有効成分 b F G F を含有してなるものである。本発明で用いる架橋ゼラチンゲルの原料となるゼラチンには、特に制限はなく、通常入手できるものでよい。このようなゼラチンとしては、例えば、等電点 4. 9 アルカリ処理ゼラチン (新田ゼラチン社製)、等電点 9. 0 酸処理ゼラチン (新田ゼラチン社製) 等が挙げられる。また、ゼラチンは、一種のみでなく、溶解性、分子量、等電点および原料等の物性の異なるものを混合して用いてもよい。

本発明で用いることのできるゼラチンを架橋するための架橋剤としては、生体に対して毒性のないものであればよいが、例えばグルタルアルデヒド、1-エチルー 3- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩、1-シクロヘキシルー 3- (2-モルホリノエチル) カルボジイミドメト-p-トルエンスルホナート等の水溶性カルボジイミド、ビスエポキシ化合物、ホルマリン等が好

ましく、グルタルアルデヒドおよび 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩が特に好ましい。

また、ゼラチンは、熱処理又は紫外線照射によっても架橋化できる。

本発明で用いる徐放性担体である架橋ゼラチンゲルの形状は特に制限はないが、例えば円柱状、角柱状、シート状、ディスク状、球状、粒子状などがある。円柱状、角柱状、シート状、ディスク状のものについては、通常インプラントとして用いられることが多く、また球状、粒子状のものは注射投与も可能である。

円柱状、角柱状、シート状、ディスク状の架橋ゼラチンゲルは、ゼラチン水溶液に架橋剤水溶液を添加するか、あるいは架橋剤水溶液にゼラチンを添加し、所望の形状の鑄型に流し込み、架橋反応させて調製することができる。また、成形したゼラチンゲルをそのまま、あるいは乾燥後に架橋剤水溶液を添加してもよい。架橋反応を停止させるには、エタノールアミン、グリシン等のアミノ基を持つ低分子物質に接触させるか、又は pH 2.5 以下の水溶液を添加する。得られた架橋ゼラチンゲルは、蒸留水、エタノール、2-プロパノール（以下、IPA という）、アセトン等により洗浄し、製剤調製に供される。

得られる架橋ゼラチンゲルの含水率は、50～99 w/w%（以下、単に%で表示する）である。ここで、ゲルの含水率とは、湿潤時のゲル全重量に対するゲル中の水分重量の割合を示す。

球状、粒子状の架橋ゼラチンゲルは、例えば、三つ口丸底フラスコに固定した攪拌用モーター（例えば新東科学社製、スリーワンモーター、EYELA mini D.C. Stirrer等）とテフロン製攪拌用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した装置に、ゼラチン水溶液を入れ、ここにオリブ油等の油を加えて 200～600 rpm 程度の速度で攪拌し、W/O 型エマルジョンとし、これに架橋剤水溶液を添加するか、ゼラチン水溶液をあらかじめオリブ油中にて前乳化（例えば vortex mixer Advantec TME-21、ホモジナイザー polytron PT10-35 等）しておいたものをオリブ油中に滴下し、微粒子化した W/O 型エマルジョンを調製し、これに架橋剤水溶液を添加し、架橋反応させ、遠心分離により架橋ゼラチンゲルを回収し、アセトン、酢酸エチル等で洗浄し、さらに IPA、エタノール等に浸漬して架橋反応を停止させることにより調製することができる。得られた架橋ゼラチンゲル

粒子は、IPA、Tween 80を含む蒸留水、蒸留水等で順次洗浄し、製剤調製に共される。

架橋ゼラチンゲル粒子が凝集する場合には、例えば、超音波照射（冷却下、1分以内程度が好ましい）等を行ってもよい。

なお、前乳化することによって、粒子サイズ20 μm 以下の微粒子状の架橋ゼラチンゲルが得られる。

得られる架橋ゼラチンゲル粒子の平均粒径は、1～1000 μm であり、目的に応じて適宜必要なサイズの粒子をふるい分けして使用する。例えば、ヒトの骨折、骨粗鬆症などの治療のために局所投与する場合は10～150 μm の粒子を用いるのが好ましい。また、得られる架橋ゼラチンゲル粒子の含水率は50～93%程度であり、適宜好ましい含水率のものを調製できる。

球状、粒子状の架橋ゼラチンゲルを調製する別法として次のような方法もある。上記の方法と同様の装置にオリブ油を入れ、200～600 rpm程度の速度で攪拌し、ここにゼラチン水溶液を滴下し、W/O型エマルジョンを調製し、これを冷却後アセトン、酢酸エチル等を加えて攪拌し、遠心分離によりゼラチン粒子を回収する。回収したゼラチン粒子をさらにアセトン、酢酸エチル等、次いでIPA、エタノール等で洗浄後、乾燥させる。乾燥ゼラチン粒子を0.1% Tween 80を含む架橋剤水溶液に懸濁させ、緩やかに攪拌しながら架橋反応させ、使用した架橋剤に応じて0.1% Tween 80を含む100 mMグリシン水溶液または0.1% Tween 80を含む0.004 N HClなどにて洗浄して架橋反応を停止することにより架橋ゼラチンゲル粒子を得ることができる。

本別法で得られる架橋ゼラチンゲル粒子の平均粒径および含水率は、上記の方法で得られるものと同様である。

架橋反応条件は、適宜選択すべきであるが、反応温度は0～40℃、反応時間は1～48時間が好ましい。

上記のようにして得られた架橋ゼラチンゲルは減圧乾燥または凍結乾燥させることもできる。

凍結乾燥は、例えば架橋ゼラチンゲルを蒸留水に入れ、液体窒素中で30分以上または-80℃で1時間以上凍結させた後に凍結乾燥機で1～3日間乾燥させる

ことにより行う。

架橋ゼラチンゲルを調製する際のゼラチンと架橋剤の濃度は、所望の含水率により適宜選択すべきであるが、ゼラチン濃度1～100w/v%（以下、単に%で示す）、架橋剤濃度0.01～100w/v%（以下、単に%で示す）（1～5400mMに相当）が好ましい。

架橋ゼラチンゲルは、原料であるゼラチンと架橋剤の濃度を変化させることにより所望の含水率とすることができる。含水率を高くするには、ゼラチン濃度、架橋剤濃度共に低くし、逆に含水率を低くするにはゼラチン濃度、架橋剤濃度共に高くすればよい。

上記のようにして調製した架橋ゼラチンゲルにbFGFを含有させるには、bFGF水溶液を架橋ゼラチンゲルに滴下して含浸させるか、架橋ゼラチンゲルをbFGF水溶液中に懸濁して再膨潤させる。

架橋ゼラチンゲルに含有させることができるbFGFの量は、架橋ゼラチンゲルの含水率等により異なるが、架橋ゼラチンゲル1mg当たり0.1～500μgが可能である。

なお、徐放期間、bFGFの放出量等は、製剤に含有されるbFGFの量、架橋ゼラチンゲルの含水率、用いたゼラチンの等電点等の物性、投与される部位などの種々の条件により異なる。

上記のようにして得られたbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤（以下、架橋ゼラチンゲル製剤という）は、凍結乾燥することもできる。凍結乾燥する場合には、例えば、液体窒素中で30分以上または-80℃で1時間以上凍結させた後に、凍結乾燥機で1～3日間乾燥させることにより行う。

本発明の架橋ゼラチンゲル製剤の有効成分であるbFGFは、脳下垂体、脳、網膜、黄体、副腎、腎、胎盤、前立腺、胸腺などの臓器より抽出されるもの、組換えDNA技術などの遺伝子工学的手法で製造されるもの、さらにこれらの修飾体であって線維芽細胞増殖因子として作用し得るものを含む。bFGFの修飾体としては、例えば上記の抽出により得られたまたは遺伝子工学的手法で得られたbFGFのアミノ酸配列においてアミノ酸が付加されたもの、アミノ酸の一部が他のアミノ酸で置換されたもの、またはアミノ酸の一部が欠損したものなどが挙

げられる。本発明においては、これらのbFGFまたはその修飾体は単独で用いてもよいし、これらの混合物として用いてもよい。

上記bFGFとしては、好ましくは、例えばWO87/01728（特表昭63-500843号公報）、WO89/04832（特表平2-504468号公報）、WO86/07595（特表昭63-500036号公報）、WO87/03885（特表昭63-501953号公報）、欧州特許出願公開第237966号明細書（特開昭63-226287号公報）、欧州特許出願公開第281822号明細書（特開平2-193号公報）、欧州特許出願公開第326907号明細書（特開平2-209894号公報）、欧州特許出願公開第394951号明細書（特開平3-61494号公報）、欧州特許出願公開第493737号明細書（特開平5-124975号公報）などに記載のものが挙げられる。

これらのbFGFのうち、WO87/01728に記載の遺伝子工学的手法で製造した下記の配列番号1の154個のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号2の153個のアミノ酸配列を有するポリペプチドが、安定性および材料として必要な量を常時供給することが容易であるという点から特に好ましい。配列番号1のアミノ酸配列を有するbFGFは、具体的には特表昭63-500843号公報の実施例に記載されているように、ヒトの腎臓のmRNAから調製された λ gt10 cDNAライブラリーからウシの1.4 kb塩基性副断片を用いてヒトのbFGFのcDNAクローンを調製し、発現ベクターを構築して前記クローンを発現することによって得られる。

配列番号 1 :

配列の性質 :

配列の長さ : 154 アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

起源

生物名 : ホモ サピエンス (Homo sapiens)

配列

```

Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr
          20           25           30
Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val
          35           40           45
Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln
 50           55           60
Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg
 65           70           75           80
Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val
          85           90           95
Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn
          100          105          110
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg
          115          120          125
Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala
          130          135          140
Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
          145          150

```

配列番号 2 :

配列の性質 :

配列の長さ : 153 アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

起源

生物名 : ホモ サピエンス (Homo sapiens)

配列

```

Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser
 1               5               10               15
Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys
                20               25               30
Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp
                35               40               45
Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala
 50               55               60
Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr
 65               70               75               80
Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr
                85               90               95
Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr
                100              105              110
Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr
                115              120              125
Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile
                130              135              140
Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
145              150

```

実施例

以下、実施例および試験例を挙げて本発明について詳細に説明するが、本発明は以下の実施例および試験例に限定されるものではない。

(実施例 1)

等電点 4.9 アルカリ処理ゼラチン（新田ゼラチン社製）水溶液（5.6%）450 μ l に、1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（同人化学社製）（以下、WSC と略す）水溶液（2.0%、107 mM に相当）を加えた後、直径 8 mm の円筒状鋳型に流し込み、4℃にて 24 時間保って、架橋反応を行った。反応終了後、0.004 N HCl 中、37℃で 1 時間処理し、架橋反応を停止し、得られた架橋ゼラチンゲルを蒸留水で 37℃、12 時間洗浄した。37℃で 24 時間にわたる水中での膨潤処理前後での架橋ゼラチンゲル重量の変化からゲルの含水率を測定したところ、95.9%であった。得られた円柱状のゲルを厚み 2 mm のディスク状に切り出した後、乾燥させた。この乾燥ゲルに 100 μ g の bFGF を含む 50 mM リン酸緩衝溶液（pH 6.0）30 μ l を滴下し、4℃で一昼夜放置することにより、bFGF 100 μ g を架橋ゼラチンゲル内に含浸させ bFGF 含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。

(実施例 2)

等電点 9.0 酸処理ゼラチン（新田ゼラチン社製）（5.6%）を用いた以外は、実施例 1 と同様の方法で bFGF 含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。架橋ゼラチンゲルの含水率は 95.2%であった。

(実施例 3)

WSC の濃度を 8.0%（428 mM に相当）とした以外は、実施例 1 と同様の条件で bFGF 含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。架橋ゼラチンゲルの含水率は 95.2%であった。

(実施例 4)

ゼラチンの濃度を 11.1%、WSC の濃度を 16.4% (856 mM に相当) とした以外は、実施例 1 と同様の方法で bFGF 含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。架橋ゼラチンゲルの含水率は 92.1% であった。

(実施例 5)

後記する表 1 に示す各濃度の等電点 4.9 アルカリ処理ゼラチン (新田ゼラチン社製) 水溶液に、同じく表 1 に示す濃度の WSC 水溶液を加えた後、直径 8 mm の円筒状鋳型に流し込み、4℃にて 24 時間、架橋反応を行った。反応終了後、0.004 N HCl 中、37℃で 1 時間処理し、架橋反応を停止し、架橋ゼラチンゲルを蒸留水で 37℃、12 時間洗浄した。37℃で 24 時間、水中での膨潤処理前後での架橋ゼラチンゲル重量の変化から、ゲルの含水率を測定した。得られた架橋ゼラチンゲルの含水率を表 1 に示した。得られた円柱状の各架橋ゼラチンゲルを厚み 2 mm のディスク状に切り出して、乾燥させた。この乾燥ゲルに 100 μ g の bFGF を含む 50 mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.0) 30 μ l を滴下し、4℃で一昼夜放置することにより、bFGF 100 μ g を架橋ゼラチンゲル内に含浸させて bFGF 含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。

(実施例 6)

上記実施例 5 で得られた含水率 80.0% の円柱状の架橋ゼラチンゲルを WSC 水溶液 (9.6%、500 mM 相当) に 24 時間浸漬することにより、含水率 63.1% の架橋ゼラチンゲルを調製した。得られた含水率 63.1% の円柱状の架橋ゼラチンゲルを厚み 2 mm のディスク状に切り出して、乾燥させた。この乾燥ゲルに 100 μ g の bFGF を含む 50 mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.0) 30 μ l を滴下し、4℃で一昼夜放置することにより、bFGF 100 μ g を架橋ゼラチンゲル内に含浸させて bFGF 含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。

(実施例 7)

後記する表 1 に示す濃度のゼラチン水溶液に、同じく表 1 に示す濃度の WSC

水溶液を加えた以外は実施例 5 と同様の方法で架橋反応を行い、架橋ゼラチンゲルを得た。得られた架橋ゼラチンゲルの含水率を表 1 に示した。得られた円柱状の各架橋ゼラチンゲルを厚み 2 mm のディスク状に切り出して乾燥させた。この乾燥架橋ゼラチンゲルに 100 μ g の bFGF を含む 50 mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.0) 30 μ l を滴下し、4℃で一昼夜放置することにより、bFGF 100 μ g をゼラチンゲル内に含浸させ、bFGF 含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。

(実施例 8)

上記実施例 7 で得られた含水率 78.5% の円柱状の架橋ゼラチンゲルを WSC 水溶液 (9.6%、500 mM に相当) に 24 時間浸漬することにより、含水率 68.9% の架橋ゼラチンゲルを調製した。得られた含水率 68.9% の円柱状の架橋ゼラチンゲルを厚み 2 mm のディスク状に切り出して乾燥させた。この乾燥架橋ゼラチンゲルに 100 μ g の bFGF を含む 50 mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.0) 30 μ l を滴下し、4℃で一昼夜放置することにより、bFGF 100 μ g をゼラチンゲル内に含浸させ、bFGF 含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。

(実施例 9)

等電点 4.9 アルカリ処理ゼラチン (新田ゼラチン社製) 水溶液 (5.6%) 0.9 ml を 250 ml のオリーブ油に加え、室温下、450 rpm にて攪拌し、W/O 型エマルジョンを調製した。これに WSC 水溶液 (16.4%、856 mM に相当) 0.1 ml を加え、一昼夜攪拌を続けてゼラチンを架橋し、架橋ゼラチンゲル粒子を得た。得られた架橋ゼラチンゲル粒子の平均粒径は 30 μ m であり、その架橋ゼラチンゲル粒子の含水率は 96.0% であった。この粒子を乾燥した後、乾燥粒子 10 mg を 100 μ g の bFGF を含む 50 mM リン酸緩衝溶液 (pH 6.0) 30 μ l に浸漬し、4℃で一昼夜放置することにより、bFGF を架橋ゼラチンゲル粒子内に含浸させ、bFGF 含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。

(実施例 10)

500ml 容三口フラスコにオリブ油 250ml を加え、固定した攪拌用モーター（新東科学社製、スリーワンモーター）にテフロン製攪拌用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した。別にオリブ油 5ml を採り 45℃ に加温した後、等電点 4.9 のアルカリ処理ゼラチン（新田ゼラチン社製）水溶液（11.1%）0.9ml を加え、ホモジナイザー（Polytron PT-35）を用いて 30 秒間の前乳化を行った。この前乳化したエマルジョンを、予め攪拌しておいたオリブ油中に加えた。このようにして得られた W/O 型エマルジョンに、WSC 水溶液（27.0%、1424mM に相当）0.1ml を加え、約 15 時間攪拌を続けてゼラチンを架橋した。架橋反応終了後、ここに 50ml のアセトンを加え、1 時間攪拌した後、遠心分離により架橋ゼラチンゲル粒子を回収した。回収した架橋ゼラチンゲル粒子をアセトンにて洗浄し（遠心 3000rpm、5 分を 5 回）、さらに 0.004N HCl を含む 2-プロパノール（以下、IPA という）中に架橋粒子を 37℃、1 時間浸漬することにより、残存する WSC による架橋反応を停止させた。反応停止後、これらの架橋粒子を IPA にて洗浄した（遠心 3000rpm、5 分を 5 回）。さらに 0.1% Tween 80 を含む蒸留水で 1 回（遠心 2000rpm、5 分）、蒸留水で 2 回（遠心 2000rpm、5 分）洗浄し、凍結乾燥させることにより架橋ゼラチンゲル粒子（平均粒径 4 μ m、含水率 91.0%）の乾燥粉末を得た。

得られた乾燥架橋ゼラチンゲル粒子 10mg に 3.3mg bFGF/1ml 1/15M リン酸緩衝液（pH 6）の 30 μ l を滴下し、4℃、一昼夜放置することにより bFGF 水溶液を粒子内に含浸させることにより、bFGF 含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。得られた bFGF 含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を凍結乾燥させることにより、bFGF 含有乾燥架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。

(実施例 11)

上記実施例 10 で得られた乾燥架橋ゼラチンゲル粒子 2mg に、8mg bFG

F/1ml 20mM クエン酸緩衝液 (pH5) の10 μ lを滴下し、4℃、一昼夜放置することによりbFGF水溶液を粒子内に含浸させることにより、bFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。得られたbFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を凍結乾燥させることにより、bFGF含有乾燥架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。

(実施例12)

上記実施例10で得られた乾燥架橋ゼラチンゲル粒子10mgに、1mg/ml bFGF水溶液200 μ lを加えて懸濁し、室温、1時間放置することによりbFGF水溶液を粒子内に吸着させることにより、bFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。得られたbFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を凍結乾燥させることにより、bFGF含有乾燥架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。

(実施例13)

1000ml容三つ口丸底フラスコにオリブ油375mlを加え、固定した攪拌用モーター（新東科学社製、スリーワンモーター）にテフロン製攪拌用プロペラを取り付け、フラスコと一緒に固定した。オリブ油を30℃、420rpmにて攪拌しながら等電点4.9アルカリ処理ゼラチン水溶液（10.0%）10mlを滴下し、W/O型エマルジョンを調製した。10分間攪拌後、フラスコを10～20℃に冷却し、30分攪拌した。冷却後、ここに100mlのアセトンを加え1時間攪拌した後、遠心分離によりゼラチン粒子を回収した。回収したゼラチン粒子をアセトンにて洗浄し、さらにIPAにて洗浄することにより未架橋ゼラチン粒子を得た。この未架橋ゼラチン粒子を乾燥させ、4℃で保存した。

乾燥した未架橋ゼラチン粒子500mgを0.1%Tween 80を含むグルタルアルデヒド（以下、GAという）（0.05%、5.0mMに相当）100mlに懸濁させ、4℃、15時間ゆるやかに攪拌することにより架橋反応を行った。反応終了後、架橋粒子を遠心分離により回収し、0.1%Tween 80を含む100mMグリシン水溶液にて37℃、1時間洗浄することにより架橋反応を停止した。反応停止後、架橋粒子を順に0.1%Tween 80水溶液、IP

A、0.1% Tween 80水溶液で洗浄し、蒸留水で2回洗浄した後に凍結乾燥を行い、乾燥架橋ゼラチンゲル粒子（平均粒径40 μ m、含水率87.0%）を得た。

得られた乾燥架橋ゼラチンゲル粒子10mgに3.3mg bFGF/1ml 1/15M リン酸緩衝液（pH6）の30 μ lを滴下し、4℃、一昼夜放置することによりbFGF水溶液を粒子内に含浸させることにより、bFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。得られたbFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を凍結乾燥させることにより、bFGF含有乾燥架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。

（実施例14）

上記実施例13で得られた乾燥架橋ゼラチンゲル粒子2mgに、8mg bFGF/1ml 20mM クエン酸緩衝液（pH5）の10 μ lを滴下し、4℃、一昼夜放置することによりbFGF水溶液を粒子内に含浸させることにより、bFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。得られたbFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を凍結乾燥させることにより、bFGF含有乾燥架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。

（実施例15）

上記実施例13で得られた乾燥架橋ゼラチンゲル粒子10mgに、1mg/ml bFGF水溶液200 μ lを加えて懸濁し、室温、1時間放置することによりbFGF水溶液を粒子内に吸着させることにより、bFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。得られたbFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤を凍結乾燥させることにより、bFGF含有乾燥架橋ゼラチンゲル粒子製剤を調製した。

（実施例16）

等電点4.9アルカリ処理ゼラチン（新田ゼラチン社製）水溶液（10.0%）20mlを直径10cmのシャーレに流し込み、乾燥させた後、この乾燥ゼラチンシートをWSC水溶液（0.04%、2.0mMに相当）浸漬し、4℃にて2

4時間保って架橋反応を行った。反応終了後、0.004N HCl中、37℃で1時間処理し、架橋反応を停止し、さらに蒸留水で37℃、12時間洗浄することにより架橋ゼラチンゲルを得た。このゲルを4×3×2mmの大きさのディスク状に切り出し、減圧乾燥を行った。得られたゲルの含水率は87.0%であった。

この乾燥架橋ゼラチンゲルに、それぞれ200μg/mlおよび1mg/mlのbFGF水溶液10μlずつを滴下し、4℃、15時間含浸させて2種類のbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。

上記実施例1～16で調製したbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤およびbFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤の処方および得られた架橋ゼラチンゲルの含水率を表1として示す。

表1中、架橋剤WSCおよびGAはそれぞれ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩およびグルタルアルデヒドを表す。また、表中のゼラチンおよび架橋剤の濃度%は、それぞれ「w/v%」を表し、含水率の%は、「w/w%」を表す。

表 1

実施例No.	ゼラチン	架橋剤	含水率(%)	最終形状	bFGF含有量
1	等電点4.97%処理ゼラチン 5.6%	WSC 2.0% (107mM)	95.9%	ディスク状	100 μ g /製剤
2	等電点9.0%処理ゼラチン 5.6%	WSC 2.0% (107mM)	95.2%	//	//
3	等電点4.97%処理ゼラチン 5.6%	WSC 8.0% (428mM)	95.2%	//	//
4	等電点4.97%処理ゼラチン 11.1%	WSC 16.4% (856mM)	92.1%	//	//
5	等電点4.97%処理ゼラチン 5.6%	WSC 2.0% (107mM)	95.9%	//	//
	等電点4.97%処理ゼラチン 11.1%	WSC 16.4% (856mM)	92.1%	//	//
	等電点4.97%処理ゼラチン 11.1%	WSC 27.0% (1424mM)	87.6%	//	//
	等電点4.97%処理ゼラチン 33.3%	WSC 80.0% (4278mM)	80.0%	//	//
	等電点4.97%処理ゼラチン 33.3%	WSC 85.0% (4568mM)	77.5%	//	//

表 1 (その2)

実施例No.	ゼラチン	架橋剤	含水率(%)	最終形状	bFGF含有量
6	実施例5で得られた含水率80.0%の架橋ゼラチンゲル	WSC 9.6% (500mM)	63.1%	ディスク状	100 μ g /製剤
7	等電点4.97%処理ゼラチン 5.6%	WSC 2.0% (107mM)	96.8%	〃	〃
	等電点4.97%処理ゼラチン 11.1%	WSC 16.4% (856mM)	91.5%	〃	〃
	等電点4.97%処理ゼラチン 33.3%	WSC 85.0% (4568mM)	78.5%	〃	〃
8	実施例7で得られた含水率78.5%の架橋ゼラチンゲル	WSC 9.6% (500mM)	68.9%	〃	〃
9	等電点4.97%処理ゼラチン 5.6%	WSC 16.4% (856mM)	96.0%	粒子状 (平均粒径 30 μ m)	100 μ g /乾燥粒子 10mg
10	等電点4.97%処理ゼラチン 11.1%	WSC 27.0% (1424mM)	91.0%	乾燥粒子状 (平均粒径 4 μ m)	100 μ g /乾燥粒子 10mg
11	〃	〃	〃	〃	80 μ g /乾燥粒子 2mg
12	〃	〃	〃	〃	230 μ g /乾燥粒子 10mg

表 1 (その3)

実施例No.	ゼラチン	架橋剤	含水率(%)	最終形状	bFGF含有量
13	等電点4.97%処理ゼラチン 10.0%	GA 0.05% (5.0mM)	87.0%	乾燥粒子状 (平均粒径 40 μ m)	100 μ g /乾燥粒子 10mg
14	〃	〃	〃	〃	80 μ g /乾燥粒子 2mg
15	〃	〃	〃	〃	200 μ g /乾燥粒子 10mg
16	等電点4.97%処理ゼラチン 10.0%	WSC 0.04% (2.0mM)	87.0%	ディスク状	①2 μ g /製剤 ②10 μ g /製剤

(試験例 1)

実施例 1 にて調製した b F G F 含有架橋ゼラチンゲル製剤をマウス背部皮下に埋入した。別に対照群として、b F G F を含まない 5 0 m M リン酸緩衝溶液 3 0 μ l を含浸させた b F G F 非含有架橋ゼラチンゲルの皮下埋入を行った。さらに別の対照群として、1 0 0 μ g の b F G F を含むリン酸緩衝溶液 1 0 0 μ l を皮下投与した。投与から 1 週間後、マウスの皮膚を剥離し、製剤埋入およびリン酸緩衝溶液投与部位をそれぞれ観察した。b F G F 含有リン酸緩衝溶液投与群では、投与部位周辺の組織の状態は未処置群と同じであり、肉眼的変化は認められなかった。しかしながら、b F G F 含有架橋ゼラチンゲル製剤を埋入した場合には、製剤埋入部位周辺の組織は肉眼的にも赤く、明らかに b F G F の作用の一つである血管新生効果が確認された。b F G F 非含有架橋ゼラチンゲル投与群の埋入部位周辺も未処置群と同様、全く血管新生像は認められなかった。

上記の結果から、b F G F 含有リン酸緩衝溶液投与群では、b F G F の薬効は全く得られない、すなわち b F G F 水溶液での投与では b F G F は生体組織中で速やかに分解され薬効を失う。これに対し、本発明の b F G F 含有架橋ゼラチンゲル製剤を用いれば、b F G F は生体組織中で分解されることなく担体である架橋ゼラチンゲルから徐放されその薬効を発揮・持続できることがわかる。また、架橋ゼラチンゲルは、生体適合性に優れていることがわかる。

(試験例 2)

実施例 1 にて調製した b F G F 含有架橋ゼラチンゲル製剤をマウス皮下に埋入し、投与から 1、3、7 および 1 4 日後における埋入部位周辺での血管新生の程度をヘモグロビン量の変化を指標に評価した。別に、対照群として b F G F を含有しない架橋ゼラチンゲルをマウス皮下に埋入した群 (b F G F (－) 架橋ゼラチンゲル投与群)、1 0 0 μ g の b F G F のリン酸緩衝溶液をマウス皮下に注射投与した群 (b F G F (＋) 水溶液投与群)、b F G F を含有しないリン酸緩衝液を注射投与した群 (b F G F (－) 水溶液投与群) についても同様に血管新生の程度を評価した。なお、新生血管量の評価は以下のように行った。製剤埋入部位または注射投与部位の皮膚の裏側ならびに背部筋側組織を、製剤埋入部位また

は注射投与部位を中心に上下左右2 cm四方をメスにて削り取った。これらの組織を0.75%の塩化アンモニウムを含有した17 mM Tris-HCl緩衝溶液(pH 7.6)中に浸漬し、ヘモグロビンを抽出した。ヘモグロビンはシアンメトヘモグロビン法(和光純薬工業株式会社製、ヘモグロビンテストワコー)にて定量した。なお、マウスの匹数は1グループ当り5匹である。各群のヘモグロビン量の経時的变化を図1および図2に示す。図中の点線は、未処置群のヘモグロビン量を示している。100 μ gのbFGFを溶液状態で投与するだけでは、その組織周辺のヘモグロビン量は変化せず、bFGF非含有リン酸緩衝溶液を投与した場合と同一レベルであった。このヘモグロビンレベルは、未処置群のヘモグロビン量と同じであった。しかしながら、同量の100 μ gのbFGFを含む架橋ゼラチンゲル製剤を埋入した場合には、埋入部位周辺のヘモグロビン量は、100 μ gのbFGFを溶液状態で投与した群に比べて、埋入3日目より有意に増加した。さらに、その状態は7日まで継続し、その後、14日目には未処置群のヘモグロビンレベルにまで減少していた。一方、bFGF(-)架橋ゼラチンゲル投与群では、そのヘモグロビン量は未処置群と同じレベルであった。

(試験例3)

実施例3にて調製したbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤(含水率95.2%)をマウス背部皮下に埋入し、投与から1、7および14日後における残存架橋ゼラチンゲル重量を測定することにより、ゲルの*in vivo*での分解性を評価した。架橋ゼラチンゲルは時間とともに分解され、投与から14日目には完全に分解され組織に吸収されていた。また、bFGFを含まない架橋ゼラチンゲルの分解性は、bFGF含有架橋ゼラチンゲルと同等であり、bFGFの含有が架橋ゼラチンゲルの分解性に与える影響は見られなかった。その結果を図3に示す。投与後数日間の残存重量が投与時よりも増加して100%を超えるのは、マウス皮下より架橋ゼラチンゲルを回収した時に、マウスの皮下組織が架橋ゼラチンゲルに付着していたためと考えられる。

なお、試験例1にて、血管新生効果が見られたbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤(含水率95.9%)も、同様の分解挙動を示した。

(試験例4)

実施例4にて調製した架橋ゼラチンゲルを乾燥した後、それぞれ0、2、10、30、50、100および290 μg のbFGFを含むリン酸緩衝溶液(pH 6.0)を含浸させ、bFGF非含有および各濃度のbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製した。これらの製剤をマウス背部皮下に埋入し、投与から7日後、製剤埋入部位周辺のヘモグロビン量を評価した。その結果を図4に示す。図中の点線は、未処置群のヘモグロビンレベルである。対照群として、0、2、10、30、50、100および290 μg のbFGF含有リン酸緩衝溶液100 μl をマウス皮下に投与した。bFGF溶液投与の場合には、その投与量に関係なく、いずれの投与量においても、ヘモグロビン量の増加は見られなかった。これに対し、bFGFを架橋ゼラチンゲルに包含した本発明製剤によれば、有意なヘモグロビン量の増加が見られ、その効果は、bFGF投与量が10 μg /マウスから認められた。

(試験例5)

実施例5および6にて調製した種々の含水率を有する架橋ゼラチンゲルからなるbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤をマウス背部皮下に埋入し、架橋ゼラチンゲルの含水率がbFGFのin vivoでの血管新生作用に及ぼす影響について調べた。製剤埋入後7日目および14日目の結果をそれぞれ図5および図6に示す。別に対照として、100 μg のbFGFを含むリン酸緩衝溶液(pH 7.4) 100 μl の皮下投与を行った。なお、図中の点線は未処置群のヘモグロビン量である。図5および6からわかるように、製剤埋入7日後ではいずれの含水率をもつゲルにおいても、そのヘモグロビン量は、bFGFの水溶液投与に比較して、有意に高い値であった。また、ヘモグロビン量は架橋ゼラチンゲルの含水率に依存し、ゲルの含水率の低下とともにヘモグロビン量は上昇した。一方、製剤埋入14日後では、含水率90%以下の架橋ゼラチンゲルからなる製剤においてのみ、高いヘモグロビン量が見られたが、それ以上の含水率をもつ架橋ゼラチンゲルからなる製剤では、ヘモグロビン量はすでに未処置群のレベルにまで低下

していた。これは、含水率が低い場合には、架橋ゼラチンゲルの分解が遅く、14日目においても、bFGFがゲル内から徐放され、その効果が発揮されていると考えられる。

(試験例6)

実施例5で調製した含水率95.9および77.5%の各架橋ゼラチンゲルからなるbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤のマウス皮下での分解性を調べた。その結果を図7に示す。分解性の評価は試験例3と同様の方法で行った。いずれの含水率のゲルも、時間とともに分解が進行している。しかし、その分解性はゲルの含水率に依存しており、含水率の低下に伴い、分解しにくくなっている。

(試験例7)

実施例7および8にて調製した各bFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤をマウス背部皮下に埋入し、架橋ゼラチンゲルの含水率がbFGFの*in vivo*での肉芽形成(エンカプシュレーション)作用に及ぼす影響について調べた。bFGFの肉芽形成作用は以下のようにして調べた。製剤埋入7日後に製剤埋入部位の皮膚の裏側ならびに背部筋側組織を、製剤埋入部位を中心に上下左右2cm四方をメスにて削り取った。これらの組織の湿潤状態での重量を測定し、肉芽形成効果を評価した。その結果を図8に示す。図中の点線は未処置群のレベルを示す。その結果、bFGFを架橋ゼラチンゲルに包含して投与することにより、bFGFの肉芽形成促進効果が見られ、製剤埋入部位の周辺はカプセル層で覆われていた。また、カプセル層の厚みは、架橋ゼラチンゲルの含水率の減少とともに増加した。これに対して、100 μ gのbFGFを水溶液状態で投与した対照群では、投与部位周辺での肉芽形成は認められなかった。このように、bFGFの作用を肉芽形成作用から評価した場合にも、bFGFを架橋ゼラチンゲル内に包含させ、徐放化することにより、その活性を増強することができることが確認された。

(試験例8)

実施例9にて調製したbFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子製剤をマウス背部皮

下に注射投与した。投与から1週間後、マウス皮膚を剥離し、粒子製剤を投与した部位での血管新生の程度を観察した。その結果、粒子製剤を投与した部位周辺が赤く、血管が新生されていることが認められた。以上のように、本発明は、bFGFを包含させるための担体である架橋ゼラチンゲルの形状に関係なく、すなわち注射可能な大きさの球状または粒子状の架橋ゼラチンゲルによっても、本発明の効果が得られることがわかる。

(試験例9)

実施例13で作製した架橋ゼラチンゲル粒子(含水率87%)3.7mgに対し、bFGF 100 μ gを4℃、一昼夜含浸させた後、生理食塩水に懸濁させ、ラット腸骨に注入した。2週間後に腸骨を取り出し、骨塩量の変動を測定した。ここで、骨塩量とは、骨の増減の程度を測るための指標であり、具体的には、骨塩量測定装置(アロカ社製、DCS-600型)によって測定した。また、bFGF 100 μ g含有水溶液を注入投与した群を対照群とし、同様に骨塩量の変動を測定した。その結果、架橋ゼラチンゲル粒子製剤投与群では、骨塩量が15.7mg増加したのに対し、bFGF含有水溶液を投与した対照群では7.1mgの増加であった。対照群と比較して、本発明のbFGF含有架橋ゼラチンゲル粒子を投与した群では著しい骨塩量の増加が認められ、架橋ゼラチンゲルで徐放化することにより水溶液製剤に比べ、有意な骨形成作用を示した。

(試験例10)

ラットの下腿部を切開し、骨を露出させ、腓骨を骨バサミにて切断した。切断部位に実施例16にて調製したbFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤を埋入し、縫合した。3週間後にラットの切断した腓骨の骨塩量および骨密度の増加を調べた。対照として、上記製剤と同量のbFGFを含有する水溶液をラットに投与した。結果を表2に示す。

表 2

b F G F 投与量 (μ g/製剤又は水溶液)	骨 塩 量 (mg)	
	架橋ゼラチンゲル製剤	水溶液
0	9.5 \pm 1.7	9.4 \pm 1.7
2	14.4 \pm 2.1	11.3 \pm 3.2
10	17.6 \pm 3.2	12.0 \pm 3.1

上記表2の結果から、本発明のb F G F架橋ゼラチンゲル製剤は、b F G F水溶液投与群に比べ、高い骨塩量の増加を促すことがわかる。このことから、本発明の架橋ゼラチンゲル製剤によれば、担体である架橋ゼラチンゲルからb F G Fが徐放されることにより、骨塩量の増加を促し、骨折、骨再生治療に有用であることが認められた。

発明の効果

本発明によれば、徐放性担体である架橋ゼラチンゲルの調製条件を変えることによって、異なる含水率つまり生体内での分解吸収性の異なるb F G F含有架橋ゼラチンゲル製剤を調製することができた。本発明の架橋ゼラチンゲル製剤から徐放されたb F G Fは生理活性を保持していた。さらに、徐放性担体である架橋ゼラチンゲルの含水率を変化させることにより架橋ゼラチンゲルの分解速度が変化し、b F G Fの徐放時間を変化させることが可能であり、その結果、生体内でのb F G Fの活性発現の持続性をコントロールできた。さらに、上記の本発明の効果はゼラチンの種類、製剤の形状に関係なく認められた。

請求の範囲

1. 塩基性線維芽細胞増殖因子を含有することを特徴とする架橋ゼラチンゲル製剤。
2. 塩基性線維芽細胞増殖因子が、下記の配列番号 1 および／または 2 で示されるアミノ酸配列を有するものである請求項 1 に記載の架橋ゼラチンゲル製剤。

配列番号 1 :

配列の性質 :

配列の長さ : 154 アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

起源

生物名 : ホモ サピエンス (Homo sapiens)

配列

```

Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr
          20           25           30
Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val
          35           40           45
Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln
 50           55           60
Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg
 65           70           75           80
Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val
          85           90           95
Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn
          100          105          110
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg
          115          120          125
Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala
          130          135          140
Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
145          150

```

配列番号 2 :

配列の性質 :

配列の長さ : 153 アミノ酸

配列の型 : アミノ酸

起源

生物名 : ホモ サピエンス (Homo sapiens)

配列

```

Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly Gly Ser
 1           5           10           15
Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Cys
          20           25           30
Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val Asp
          35           40           45
Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu Gln Ala
 50           55           60
Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg Tyr
 65           70           75           80
Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val Thr
          85           90           95
Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn Thr
          100           105           110
Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg Thr
          115           120           125
Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala Ile
          130           135           140
Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
145           150

```

3. ゼラチンの架橋剤が、グルタルアルデヒドまたは水溶性カルボジイミドである請求項1に記載の架橋ゼラチンゲル製剤。
4. 水溶性カルボジイミドが、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-N-メチル-2-ピリデンエンスルホナートからなる群より選ばれる請求項3に記載の架橋ゼラチンゲル製剤。
5. ゼラチンの架橋剤がグルタルアルデヒドまたは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩である請求項3に記載の架橋ゼラチンゲル製剤。
6. 架橋ゼラチンゲルが、ゼラチンの濃度1~100w/v%および架橋剤濃度0.01~100w/v%からなる請求項1に記載の架橋ゼラチンゲル製剤。
7. 架橋ゼラチンゲルの含水率が、50~99%である請求項1に記載の架橋ゼラチンゲル製剤。
8. 架橋ゼラチンゲルの形状が、円柱状、角柱状、シート状、ディスク状、球状または粒子状である請求項1に記載の架橋ゼラチンゲル製剤。
9. 塩基性線維芽細胞増殖因子の水溶液を架橋ゼラチンゲルに接触させ含浸させるか、または塩基性線維芽細胞増殖因子の水溶液中に架橋ゼラチンゲルを懸濁させることにより塩基性線維芽細胞増殖因子を架橋ゼラチンゲルに含有させることを特徴とする請求項1に記載の架橋ゼラチンゲル製剤。
10. 請求項1に記載の塩基性線維芽細胞増殖因子含有架橋ゼラチンゲル製剤を乾燥させたことを特徴とする乾燥架橋ゼラチンゲル製剤。

11. 請求項1～10に記載の架橋ゼラチンゲル製剤からなる骨疾患治療剤。

1 / 6

図 1

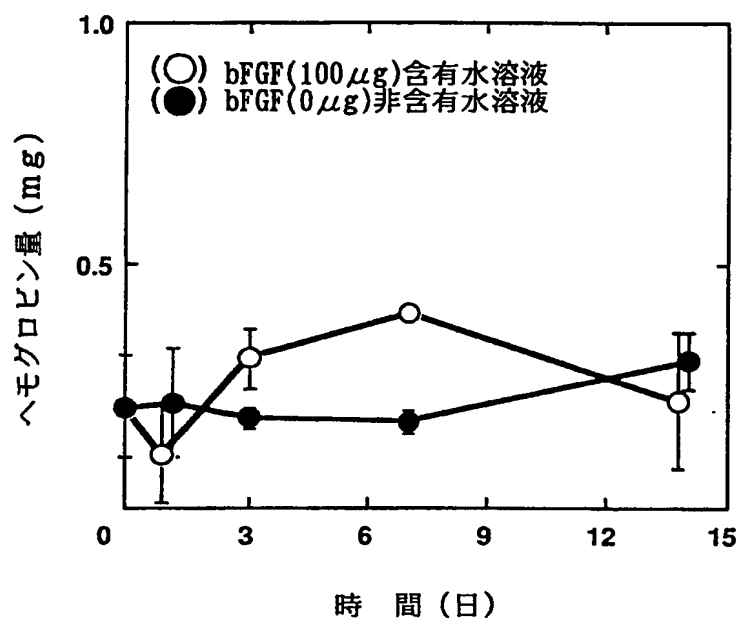
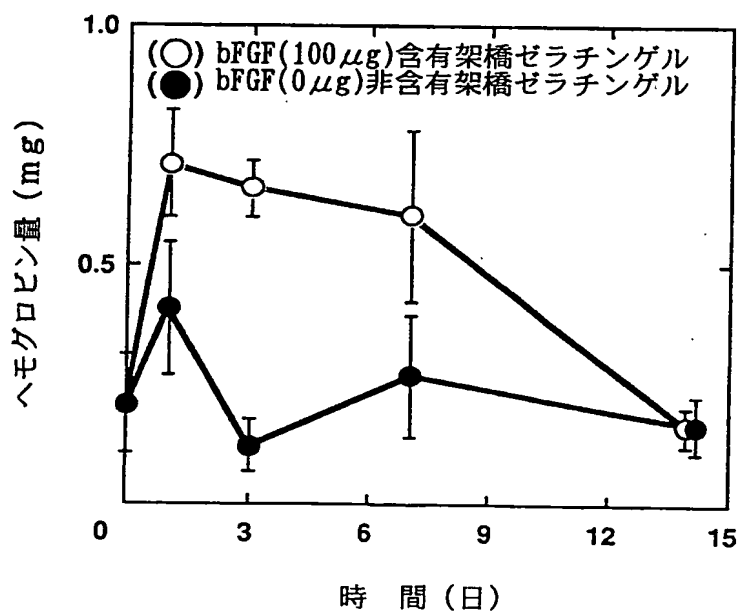
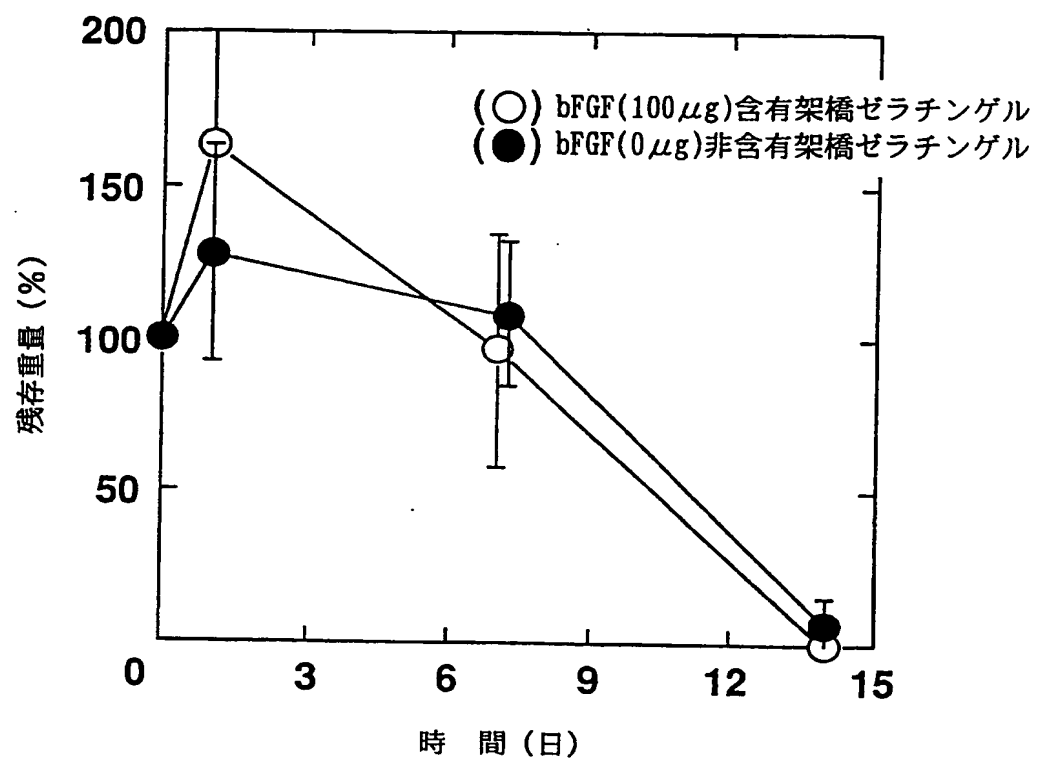


図 2



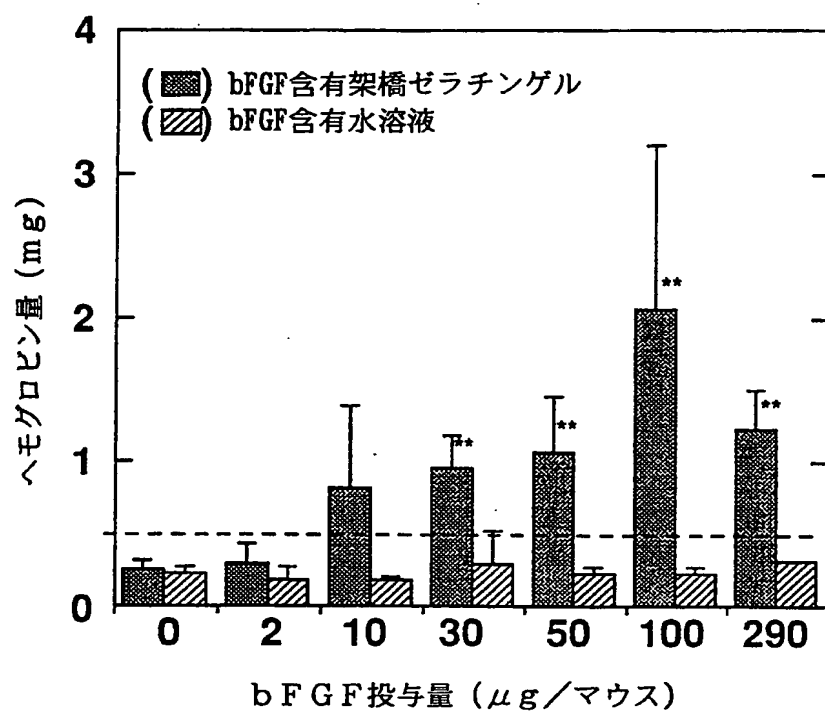
2 / 6

図 3



3 / 6

図 4

(** : $p < 0.01$)

4 / 6

図 5

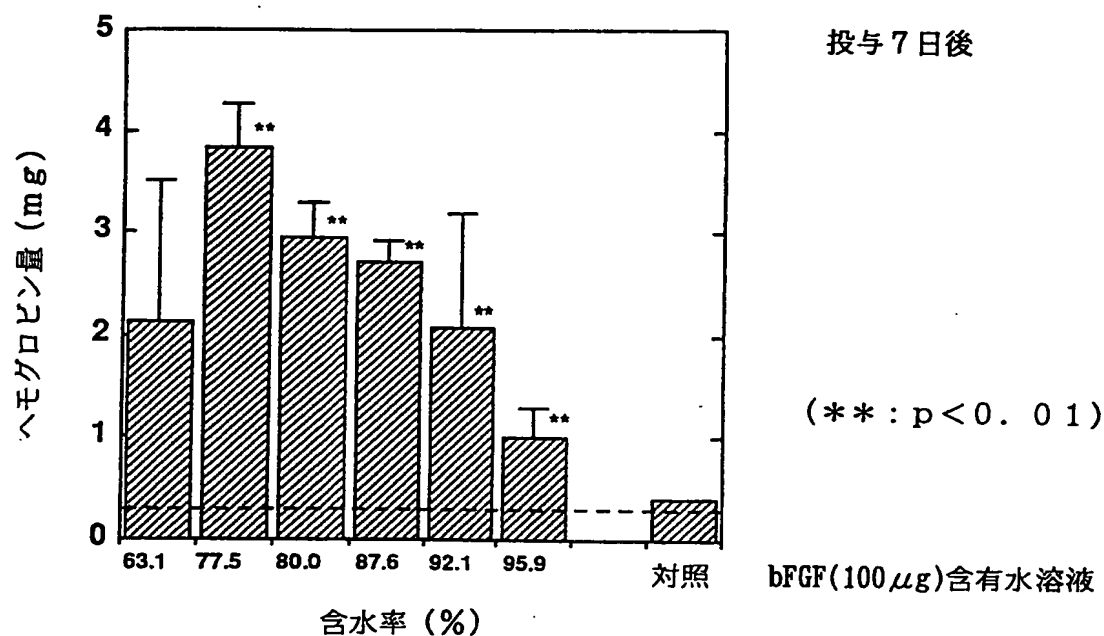
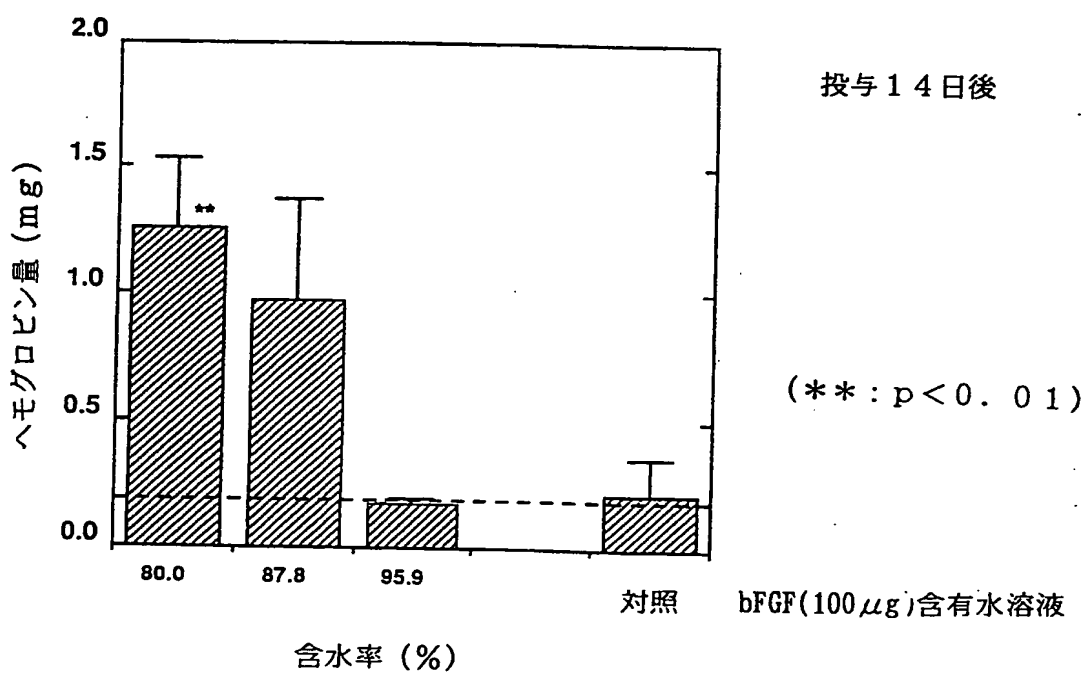
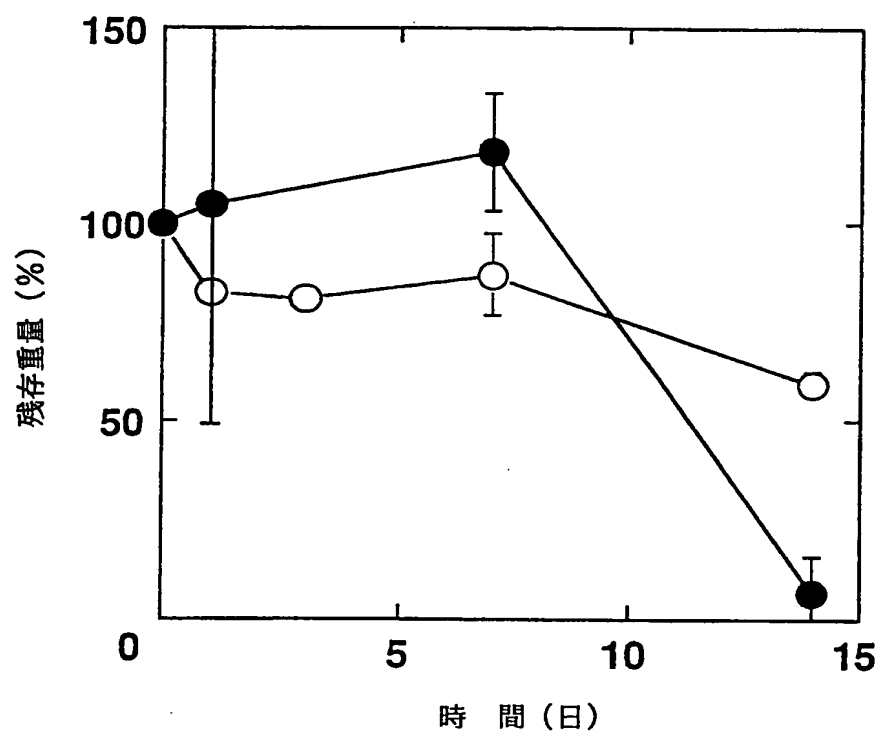


図 6



5 / 6

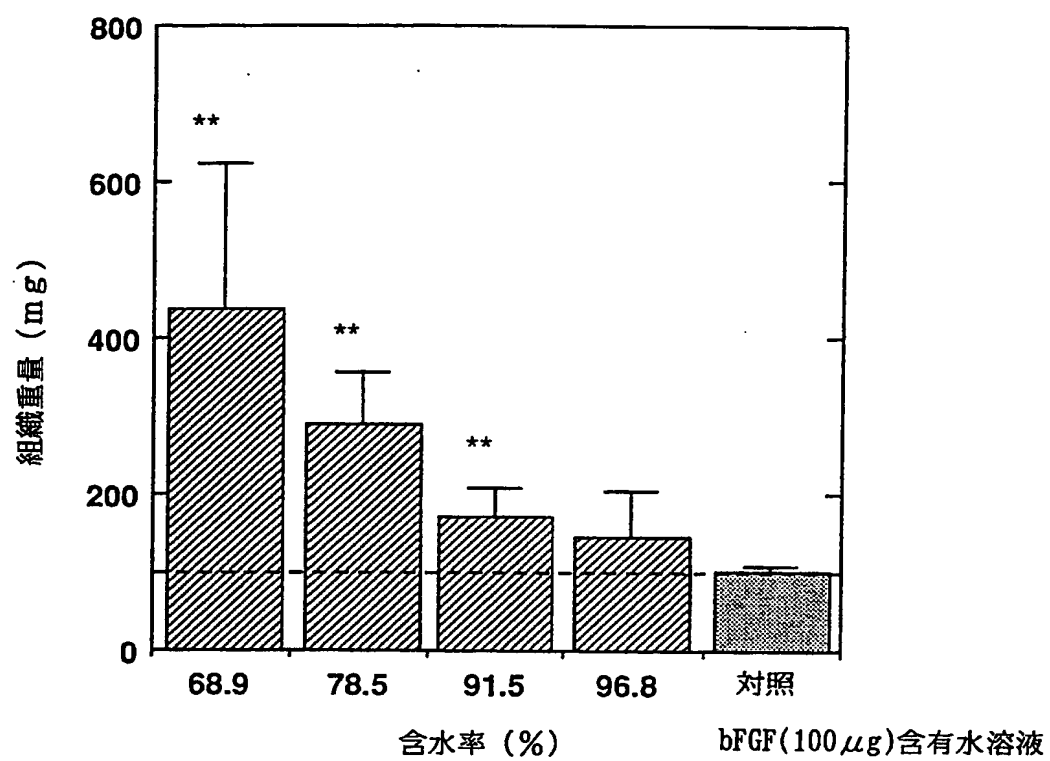
図 7



(○) 含水率77.5%bFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤
(●) 含水率95.9%bFGF含有架橋ゼラチンゲル製剤

6 / 6

図 8

(** : $p < 0.01$)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/00876

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ A61K37/24, 47/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ A61K37/24, 47/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, A, 5-124975 (Kaken Pharmaceutical Co., Ltd.), May 21, 1993 (21. 05. 93) & EP, A, 493737	1-11
Y	JP, A, 4-279530 (Farmitalia Carlo Erba S.r.l.), October 5, 1992 (05. 10. 92) & DE, A, 4121891 & GB, A, 2245831	1-11
Y	JP, A, 2-49734 (Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.), February 20, 1990 (20. 02. 90), (Family: none)	1-11
Y	JP, A, 62-289530 (Eisai Co., Ltd.), December 16, 1987 (16. 12. 87), (Family: none)	1-11
Y	JP, A, 62-228028 (Sumitomo Pharmaceutical Co., Ltd.), October 6, 1987 (06. 10. 87) & EP, A, 230647 & US, A, 4849141	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 12, 1994 (12. 08. 94)

Date of mailing of the international search report

August 30, 1994 (30. 08. 94)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00876

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 5-132426 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), May 28, 1993 (28. 05. 93) & EP, A, 499242 & CA, A, 2061211	1-11
A	JP, A, 4-330017 (Childrens' Medical Center Corp.), November 18, 1992 (18. 11. 92) & EP, A, 457223 & US, A, 5202311	1-11
A	JP, A, 4-128239 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), April 28, 1992 (28. 04. 92) & EP, A, 406856 & US, A, 5189148	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K37/24, 47/42

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A61K37/24, 47/42

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, A, 5-124975 (科研製薬株式会社), 21. 5月. 1993 (21. 05. 93) & EP, A, 493737	1-11
Y	JP, A, 4-279530 (ファルミタリア・カルロ・エルバ・ エッセ・エルレ・エルレ), 5. 10月. 1992 (05. 10. 92) & DE, A, 4121891 & GB, A, 2245831	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 08. 94

国際調査報告の発送日

30.08.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

松 浦 新 司

⑤

4 C

8 3

1 4

電話番号 03-3581-1101 内線

3 4 5 2

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, A, 2-49734 (湧永製薬株式会社), 20. 2月. 1990 (20. 02. 90) (ファミリーなし)	1-11
Y	JP, A, 62-289530 (エーザイ株式会社), 16. 12月. 1987 (16. 12. 87) (ファミリーなし)	1-11
Y	JP, A, 62-228028 (住友製薬株式会社), 6. 10月. 1987 (06. 10. 87) & EP, A, 230647 & US, A, 4849141	1-11
A	JP, A, 5-132426 (武田薬品工業株式会社), 28. 5月. 1993 (28. 05. 93) & EP, A, 499242 & CA, A, 2061211	1-11
A	JP, A, 4-330017 (チルドレンズ・メディカル・センター ・コーポレーション), 18. 11月. 1992 (18. 11. 92) & EP, A, 457223 & US, A, 5202311	1-11
A	JP, A, 4-128239 (武田薬品工業株式会社), 28. 4月. 1992 (28. 04. 92) & EP, A, 406856 & US, A, 5189148	1-11